

RECEȚIONAT

Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare

La data: _____

AVIZAT

Secția AȘM _____

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL
privind executarea proiectului de cercetări științifice
Concursul comun al proiectelor de cercetare STCU-AȘM
perioada de implementare a proiectului 2018-2019

Proiectul (titlul) **Elaborarea tehnicii noi de evaluare a rezistenței tomatelor la fitoplasmă**

Cifrul Proiectului **18.80013. 5107.05.STCU/6378**

Direcția Strategică **Biotehnologii (16.05, 5107)**

termen de executare: 31 decembrie 2019

Conducătorul proiectului Zamorzaeva-Orleanscaia Irina _____

Directorul organizației Andronic Larisa _____

Consiliul științific/senat Andronic Larisa _____

L.Ș.

CHIȘINĂU 2019

CUPRINS:

1. Scopul și obiectivele propuse spre realizare în cadrul proiectului.....	3
2. Rezultatele științifice obținute în cadrul proiectului.....	3
3. Cele mai relevante realizări obținute în cadrul proiectului.....	9
4. Participarea în programe și proiecte internaționale.....	9
5. Colaborări științifice internaționale/naționale.....	9
6. Vizite ale cercetătorilor științifici din străinătate.....	9
7. Teze de doctorat/postdoctorat susținute pe parcursul realizării proiectului.....	9
8. Manifestări științifice organizate la nivel național/internațional.....	9
9. Aprecierea activității științifice promovate la executarea proiectului.....	9
10. Rezumatul raportului.....	9
11. Concluzii.....	10
12. Bugetul proiectului, lista executorilor, lista tinerilor cercetători, doctoranzilor.....	11
13. Lista publicațiilor științifice ce țin de rezultatele obținute în cadrul proiectului.....	12
14. Participări la manifestări științifice naționale/internaționale.....	13

1. Scopul și obiectivele propuse spre realizare în cadrul proiectului .

Scopul:

Dezvoltarea unui nou sistem de evaluare a rezistenței tomatelor la fitoplasmă bazat pe diagnosticul molecular al plantelor infectate în dinamică, la diferite etape de dezvoltare. Analiza comparativă a apariției fitoplasmei la plantele de tomate la diferite soiuri pe parcursul perioadei de vegetație în câmp trebuie să fie realizată utilizând acest sistem.

Obiectivele:

1. Selectarea celei mai rapide metode de izolare a ADN-ului din plantele de tomate și evaluarea fiabilității acestora în comparație cu rezultatele obținute prin metoda ISO 21571-2014 de extracție a ADN.
2. Design-ul primerilor specifici pentru ‚*Ca. P. solani*’ și selectarea condițiilor PCR (*nested-PCR*) care asigură o detecție precisă și rapidă a fitoplasmei în plante.
3. Identificarea ‚*Ca. P. solani*’ în diferite grupuri de soiuri de tomate. Fiecare grup va consta din subgrupe care variază în funcție de etapele de dezvoltare a plantelor.
4. Utilizarea analizei PCR cantitativ pentru o evaluare mai precisă a rezistenței la fitoplasma a diferitor genotipuri de tomate.
5. Elaborarea sistemului de procedee de evaluare a rezistenței tomatelor la fitoplasmă și evidențierea validității lui.

2. Rezultatele științifice obținute în cadrul proiectului.

Inițial a fost efectuată analiza datelor din literatură referitoare la diagnosticul molecular al infecției ‚*Ca. P. solani*’ în plante. De regulă, identificarea fitoplasmozei se realizează cu ajutorul analizei *nested-PCR* și RFLP. Cercetarea noastră a fost bazată pe designul primerilor pentru realizarea analizei PCR sau *nested-PCR*. Apoi a fost efectuată analiza comparativă în baza de date GenBank. Analiza BLAST a secvențelor nucleotidice ‚*Ca. P. solani*’ (genele ribozomale, gena chaperonin, gena factorului de translație) obținute în numeroase laboratoare ale diferitor țări a permis să alegem site-uri ale genelor total identice. Pe baza acestor site-uri s-au creat primerii chaperonine. Pentru crearea primerilor s-a aplicat softul Primer 3.

În designul primerilor s-au luat în considerație următorii parametri:

- Temperatura de topire (~ 60 °C);
- Lungime primerilor în intervalul a 20-30 nucleotide;
- Conținutul CG de 40-60%;
- Lungimea fragmentului amplificat de 200-800 bp;
- Auto-complementaritate nu mai mare de 3 bp la capătul 3' și nu mai mare de 5 bp la capătul 5'.

Tabelul 1. Primeri chaperonine specifici pentru diagnosticul molecular al ,*Ca. P. solani*'

Forward	Secvențe (5'->3')	Lungimea	Start	Stop	T top
ps1	GCTGCTCAAACAGTTGCACA	20	364	383	59.90
ps2	TGCCGGTAGTGGAGAAATTGG	21	450	470	60.34
ps3	ACGGCGTGATTAATGTCGATGA	22	509	530	60.48
Reverse					
ps4	AAGACTCCCAAAACTTCGTTTTCA	24	779	756	59.30
ps5	TGACTTGTTGCAGCCCCTAC	20	1010	991	60.25
ps6	TCGACTAATGCCTTACCGCC	20	1253	1234	59.90

Deci, s-au creat șase primeri pentru detectarea ,*Ca. P. solani*' pe baza secvenței de nucleotide a genei chaperonine (Tabelul 1). Acești primeri pot fi utilizați pentru identificarea prezenței ,*Ca. P. solani*' în diferite grupuri de soiuri de tomate. Perechile acestor primeri au fost evaluate în timpul selecției condițiilor *nested*-PCR.

Au fost estimate câteva combinații de primeri pentru diagnosticul molecular eficient al ,*Ca. P. solani*' în plantele de tomate prin analiză *nested*-PCR. Pentru estimarea primerilor a fost utilizat ADN extras din plante puternic infectate cu fitoplasmă.

Pentru efectuarea experimentelor moleculare plantele ale cinci soiuri de tomate autohtone au fost cultivate pe loturile experimentale ale IGFPP. O serie de practici agricole au fost aplicate în câmp în timpul cultivării plantelor de tomate.

Observațiile morfologice au fost efectuate pentru a înregistra stadiile de maturizare a fructelor a diferitor soiuri de tomate pe parcursul perioadei de vegetație. Unele caracteristici morfologice, inclusiv simptomele fitoplasmozei și gradul de infectare, au fost studiate până la sfârșitul perioadei de vegetație la plantele a cinci soiuri de tomate (Elvira, Cerasus, Deșteptarea, Mary Graciously, Tomiș). Materialul vegetal (frunze, fructe și peduncule) a fost colectat în câmpul de tomate. Fructele cu peduncule au fost înghețate pentru extragerea ulterioară a ADN.

Condițiile metodelor rapide de izolare a ADN-ului din plantele de tomate (metoda alcalină expres, metoda "microwave") au fost testate la stadiile timpurii și tardive de dezvoltare a plantelor de tomate. A fost efectuată compararea diferitor metode de extragere a ADN pentru diagnosticul molecular mai eficient al fitoplasmei.

Metoda alcalină de izolare a ADN-ului din peduncul care este o metodă rapidă și relativ ieftină, a fost testată la plante de tomate infectate cu fitoplasma. Au fost obținute rezultate fiabile. La fel, sa stabilit că diagnosticul molecular al fitoplasmei este posibil și la sfârșitul perioadei de vegetație folosind peduncule colectate din plantele fără fructe. Dezavantajul al acestei metode este că ADN-ul obținut nu poate fi păstrat mai mult de câteva ore.

Metoda de izolare a ADN-ului "microwave" este foarte rapidă și nu necesită folosirea reactivelor chimice. Un număr de plante cu un grad diferit de infectare cu fitoplasmă au fost analizate utilizând această metodă. Rezultatele obținute au fost comparate prin analiza *nested*-PCR. S-a stabilit că sensibilitatea metodei permite obținerea unor rezultate valide atunci când infectarea este semnificativă. Din păcate ADN-ul obținut prin metoda alcalină și metoda "microwave", nu poate fi păstrat mai mult de câteva ore.

A fost elaborată o metodă suplimentară de extracție a ADN-ului utilizând acetat de potasiu 5M. Această metodă ca și metodele menționate mai sus, este rapidă, extracția ADN din fructe sau frunze de tomate se poate realiza în câteva ore. ADN-ul obținut poate fi păstrat timp de câteva luni. Rezultate fiabile au fost obținute și în cazul extragerii ADN-ului din fructele colectate atât la etapele timpurii cât și la etapele tardive de dezvoltare a plantelor de tomate.

Validitatea metodei de izolare a ADN-ului expres alcaline și utilizând K-acetat pentru diagnosticul molecular al '*Ca. P. solani*' în plantele de tomate a fost confirmat prin compararea cu rezultatele obținute prin metoda extragerii ADN cu CTAB în conformitate cu ISO 21571-2014. Estimarea a fost efectuată la două soiuri de tomate în luna iulie (începutul maturării fructelor) și septembrie (sfârșitul perioadei de maturare a fructelor în masă).

Pentru identificarea '*Ca. P. solani*' în plante de tomate ale diferitor soiuri grupate în funcție de stadia ontogenetică și selectarea condițiilor pentru analiza *nested*-PCR au fost utilizate metodele optimizate "alcalină expres" și "K-acetat" pentru obținerea ADN-ului.

Infecția '*Ca. P. solani*' a fost analizată în primul sezon de vegetație (2018) în plantele de tomate ale cinci soiurilor de la etapa de formare a fructelor până la etapa de coacere a fructelor în masă.

Diagnosticul molecular al infecției '*Ca. P. solani*' în plantele de tomate ale trei soiuri (Elvira, Cerasus, Deșteptarea) a fost efectuat la etapa de fructe verzi. La această etapă a fost înregistrat un număr mic de plante infectate pentru toate soiurile analizate. Soiul Cerasus a fost mai puțin afectat cu fitoplasma în comparație cu Elvira și Deșteptarea.

Diagnosticul molecular al '*Ca. P. solani*' în plantele ale patru soiuri de tomate (Elvira, Cerasus, Deșteptarea, Mary Gratifully) a fost efectuat pe peduncule colectate în august. Rezultatele au demonstrat unele diferențe în numărul de plante infectate la unele soiuri. Astfel, infecția '*Ca. P. solani*' a fost mai puțin abundentă la soiurile Cerasus (35%) și Mary Gratifully (50%) și mai abundentă la Elvira (80%) și Deșteptarea (80%).

Diagnosticul molecular al soiurilor de tomate menționate mai sus, realizat pe baza materialul colectat în septembrie (la sfârșitul perioadei de plantare), a demonstrat aceleași tendințe privind abundența infecției. În același timp, diferențele dintre soiuri s-au manifestat mai puțin. Procentul de plante infectate este de 55% pentru Cerasus, 80% pentru Elvira, 85% pentru Deșteptarea și 75% pentru Mary Gratifully.

Identificarea ‚*Ca. P. solani*’ în fructele de tomate ale soiului Tomiș a fost efectuată în lunele iulie (începutul coacerii fructelor) și septembrie (sfârșitul perioadei de vegetație). Au fost obținute rezultatele neuniforme, în urma cărora am observat o scădere slabă al numărului de plante infectate în septembrie. Datele primite necesită o studiere suplimentară.

A fost realizată prelucrarea statistică a datelor despre infecția fitoplasmică la tomate și a fost elaborat soft-ul, care permite, în primul rând, calcularea semnificației diferenței dintre două populații originale (valoarea P în conformitate cu criteriului Fișer) cât și calcularea semnificației diferenței dintre toate perechile de subpopulații alese aleatoriu (analiza Jackknife). Acest soft ne oferă posibilitatea de a compara perechile de populații în volumul de la 5 la 20 de plante individuale (și mai mult, dacă este necesar). Analiza Jackknife permite obținerea rezultatelor de la 10 000 de realizări. Pentru calculele noastre am limitat numărul de realizări la 100. În plus, soft-ul permite calcularea mediei de semnificație și a abaterei standart ca și a cazurilor în care valoarea P este mai mică de 0,05.

Utilizând Soft-ul elaborat, datele sumare (rezultatele identificării prezenței, ‚*Ca. P. solani*’ în grupele soiurilor de tomate acumulate în perioada de vegetație a tomatelor în anul 2018) au fost prelucrate statistic în conformitate cu criteriul Fisher și metoda Jackknife.

În al doilea rând, datele statistice obținute au permis clasificarea preliminară a soiurilor de tomate analizate în conformitate cu sensibilitatea lor la infecția fitoplasmică: soiul Cerasus fiind mai rezistent în comparație cu soiul Elvira.

Având în vedere rezultatele prelucrării statistice, au fost trase trei concluzii principale referitoare la schema experiențelor în câmp pentru anul 2019:

- Au fost selectate două soiuri de tomate cu sensibilitate contrastă la infecția ‚*Ca. P. solani*’. Anume, soiul Elvira este mai sensibil în comparație cu Cerasus. În plus, forma spontană *Solanum habrochaites* a fost inclusă în experimentul de câmp ca control adăugător.
- Perioada de maturare în masă a fructelor este cea mai potrivită pentru estimarea rezistenței soiurilor de tomate la infecția fitoplasmică. În condițiile Moldovei, această perioadă este de la sfârșitul lunii iulie până la sfârșitul lunii august.
- Analiza moleculară a 12 plante ale unui soi este suficientă pentru obținerea rezultatelor semnificative din punct de vedere statistic. Diferențele înregistrate la începutul maturării fructelor (iulie), precum și la sfârșitul sezonului de creștere (septembrie), au fost mai puțin distincte și necesită un număr mare de eșantioane (19-20 de plante) pentru semnificație $P \leq 0,05$.

Schema experiențelor în câmp pentru anul 2019 a fost optimizată pe baza concluziilor principale menționate mai sus. Semințele de tomate ale două soiuri autohtone (Elvira, Cerasus) și formei spontane *Solanum habrochaites* au fost semănate și cultivate în sera a IGFP pentru obținerea răsadurilor. O serie de practici agricole necesare au fost aplicate în timpul cultivării răsadului de tomate în seră. La sfârșitul lunii mai plantele tinere de tomate (răsaduri) au fost plantate pe loturile experimentale ale IGFP în două repetări. Practicile agricole necesare au fost aplicate în luna iunie.

În decursul sezonului de vegetație 12 plantele ale fiecărui soi de tomate și a formei spontane *Solanum habrochaites* cultivate în câmp au fost folosite în analizele moleculare ca material vegetal (frunze, fructe și peduncule) pentru identificarea infecției ‚*Ca. P. solani*’, sau înghețat pentru experimentele planificate în etapele următoare ale proiectului.

A fost realizată identificarea ‚*Ca. P. solani*’ în plante de tomate ale diferitor soiuri grupate în funcție de stadia ontogenetică. Diagnosticul molecular s-a realizat în luna iulie, august și septembrie. Izolarea ADN-ului s-a efectuat prin metoda expres din pedunculul fructelor de tomate a soiurilor Elvira, Cerasus și a formei spontane *Solanum habrochaites*. În urma analizei *nested*-PCR, infecția ‚*Ca. P. solani*’ a fost determinată în 25% din probele ambelelor soiuri analizate în luna iulie. În luna august (etapa coacerii fructelor în masă) diagnosticul molecular al infecției fitoplasmice la soiurile analizate a demonstrat creșterea procentului de plante infectate la soiul Elvira, constituind 50%. Procentul plantelor infectate a soiului Cerasus a ramas la valoarea de 25% în luna august. Pe când, în septembrie procentul infecției la ambele soiuri analizate a constituit 58%. Infecția ‚*Ca. P. solani*’ nu a fost identificată în probele formei spontane *Solanum habrochaites* la nici o etapă ontogenetică. Astfel s-a confirmat că specia de tomate *Solanum habrochaites* poate fi utilizată ca control pentru că plantele ale acestei specii nu a fost infectate cu ‚*Ca. P. solani*’ în decursul sezonului de vegetație. La fel s-a determinat că diferența în sensibilitate a soiurilor de tomate la infecția fitoplasmică poate fi înregistrată la etapa coacerii fructelor în masă prin diagnosticul molecular al 12 plante ale fiecărui soi.

A fost realizată selectarea condițiilor pentru *one-step* PCR (PCR într-o singură etapă) cu primeri specifici pentru ‚*Ca. P. solani*’. Pentru diagnosticul molecular eficient al infecției ‚*Ca. P. solani*’ în plantele de tomate unele combinații de primeri ps au fost estimate prin analiza *one-step* PCR. ADN-ul extras din plantele infectate cu fitoplasmă a fost utilizat pentru estimare. În special, ADN-ul din fructele soiului de tomate mai sensibil la ‚*Ca. P. solani*’ a fost izolat (Elvira). Câțeva perechi de primeri au fost analizate suplimentar pe baza ADN-ului izolat din plantele mai puțin infectate cu fitoplasmă (soiul Cerasus). Au fost testate 9 perechii de primeri ps specifici pentru ‚*Ca. P. solani*’: ps1-ps4, ps1-ps5, ps1-ps6, ps2-ps4, ps2-ps5, ps2-ps6, ps3-ps4, ps3-ps5, ps3-ps6. Cele mai veridice rezultate s-au obținut folosind perechea de primeri ps1-ps4: procentul plantelor infectate cu fitoplasma la soiurile Elvira și Cerasus a fost același ca în analiza *nested*-PCR. La fel, perechea de primeri ps3-ps4 poate fi utilizată pentru identificarea fitoplasmei, dar benzile electroforetice (semnele de infecție) au fost mai puțin distincte în acest caz. A fost elaborat programul optim pentru PCR cu primerii alesi ps1-4 și ps3-Astfel, *one-step* PCR poate fi efectuat numai cu ADN-ul cu un grad înalt de purificare. În cazul izolării ADN-ului prin metoda expres au fost obținute rezultate fals negative.

Condițiile pentru diagnosticul cantitativ al ‚*Ca. P. solani*’ în plante de tomate au fost studiate. Trei tehnici au fost analizate pentru estimarea cantitativă a infecției fitoplasmice în plante .

În primul rând, a fost studiată posibilitatea de cuantificare a infecției fitoplasme în plantele de tomate ale soiurilor cu grad diferit de rezistență prin metoda RT-PCR (*Reverse Transcription PCR*). Plantele

de tomate (fructe), în care prezența fitoplasmei a fost identificată în experimente preliminare prin analiza *nested*-PCR, au fost testate utilizând metoda RT-PCR. Pentru a evalua prezența fitoplasmelor care se expresează activ în plantele de tomate studiate, s-a efectuat analiza ARN-ului. În cadrul lucrării au fost utilizate kit-ul *OneTaq RT-PCR (BioLab)* și sistemul *SuperScript IV* cu un singur pas RT-PCR (*Thermo Fisher Scientific*). Kit-ul *OneTaq RT-PCR* prevede efectuarea reacției în două etape, prima - reacția de sinteză a cADN, a doua - PCR. Prin urmare, utilizarea este consumatoare de timp. Astfel, s-a constatat că toate probele studiate au dat rezultate pozitive privind transcrierea genei chaperonine de ,*Ca. P. solani*'. În cele din urmă, datele obținute coincid cu rezultatele primite ale analizei ADN-ului acestor probe prin *nested*-PCR. Concluzia este că analiza moleculară a ADN-ului patogenului în tomate este mai preferabilă, mai rentabilă și mai rapidă. În plus, manipularea cu ARN (molecule instabile în comparație cu moleculele de ADN) necesită o respectare strictă a sterilității ridicate și a temperaturii scăzute pentru a evita rezultatele fals negative.

În al doilea rând, a fost analizată posibilitatea utilizării PCR în timp real (*Real-Time PCR*, sau RT-PCR) pentru cuantificarea infecției fitoplasmice în plantele de tomate. Studiul la această etapă a Proiectului a fost îndreptat spre crearea primerelor pentru *Real-Time PCR* pe baza secvenței nucleotidice de genă chaperonină a ,*Ca. P. solani*'. Designul primelor a fost realizat folosind soft-ul Primer 3 și luând în considerare cerințele suplimentare specifice pentru analiza RT-PCR: Temperaturi de topire a primerilor - 60°-65°C; Conținutul maxim de GC în primerul 3' - 2; Auto-complementaritate maximă - 5; Complementaritatea maximă a perechilor - 5.

Astfel, au fost create patru primeri pentru detectarea prin metoda *Real-Time PCR*: *forward* qfys5, qfys7; *reverse* qfys6, qfys8. Au fost selectate parametrii pentru RT-PCR și reactivii necesari, inclusiv colorantul SYBR Green. Au fost determinat că perechea cea mai informativă de primeri pentru diagnosticul molecular cantitativ al ,*Ca. P. solani*' în plantele de tomate este qfys7-qfys8. Concentrația mare de primeri (400 nM) în reacție nu a dat formarea dimerilor de primeri (un singur vârf în curba de topire, diluția de 500 ori). La fel patru diluții (de 10 ori, 100 ori, 1000 ori și 10000 ori) ale reacției PCR inițiale au demonstrat eficiența primerilor de 100% (coeficientul -3.3183).

În al treilea rând, tehnica "semi-cantitativă" a fost elaborată pentru cuantificarea infecției fitoplasmice în plantele de tomate. Această tehnică se bazează pe un număr de diluții consecutive ale ADN-ului extras din plante de tomate. Un pas de diluare a constat din 1/5. Soluțiile obținute s-au utilizat ca ADN probe în analiza *nested*-PCR. Mai multe variante ale acestei tehnici au fost aplicate pe ADN din soiuri de tomate cu rezistență diferită la ,*Ca. P. solani*'. Ca rezultat, concluzia principală a fost făcută că tehnica "semi-cantitativă" este veridică pentru cuantificarea ,*Ca. P. solani*' în grupurile de soiuri de tomate. S-au selectat rândurile de diluare a ADN-ului (de la 3×10^{-4} până la 4×10^{-9}), primerii și parametrii pentru *nested*-PCR care pot fi utilizați pentru cercetările ulterioare.

3. Cele mai relevante realizări obținute în cadrul proiectului .

A fost elaborată metoda de detecție sigură și rapidă a infecției ,*Ca. P. solani*' la tomate. A fost determinat volumul optimal și în perioada de vegetație cea mai informativă privind obținerea unor diferențe semnificative în evaluarea procentului de plante infectate a diferitor genotipuri sunt importante pentru estimarea rezistenței acestor genotipuri la infecția fitoplasmică.

4. Participarea în programe și proiecte internaționale (ORIZONT 2020, COST...), inclusiv propunerile înaintate/proiecte câștigate în cadrul concursurilor naționale/internaționale

1. Proiectul STCU-AȘM # 6225 (2017-2019) “Monitoringul molecular al celor mai importante boli fungice și bacteriene în livezile de meri din Moldova”.
2. Proiect de cercetare comun AȘM și ASȘIU, nr. 08/Ua, „Diagnosticul maladiilor rădăcinii grâului”
3. Proiectul moldo-belarus 2019-2020 “Analiza complexă a acumulării micotoxinelor în produse alimentare pe parcursul depozitării”.
4. Participarea în cadrul proiectului internațional COST, acțiunea CA18127- „International Nucleome Consortium”.

5. Colaborări științifice internaționale/naționale.

A fost realizată discuția rezultatelor obținute privind rezistența soiurilor de tomate analizate la infecția fitoplasmică cu prof. Bertaccini A. (Universitatea din Udine, Italia). A fost efectuată participarea la Conferința a 5-a al Grupului de Lucru Internațional de Fitoplasmologiști (8-12 septembrie 2019, Valencia, Spania), unde rezultatele obținute au fost discutate cu dr. R. Musetti (Italia), dr. B. Duduc (Serbia) și alți savanți în domeniu.

6. Vizite ale cercetătorilor științifici din străinătate.

Nu au fost efectuate

7. Teze de doctorat/postdoctorat susținute pe parcursul realizării proiectului.

Nu au fost realizate

8. Manifestări științifice organizate la nivel național/internațional.

Nu au fost efectuate

9. Aprecierea activității științifice promovate la executarea proiectului (premiu, medalii, diplome etc.).

Nu au fost

10. Rezumatul raportului cu evidențierea rezultatului, impactului, implementărilor, recomandărilor.

Cercerarea dată a permis analiza multilaterală privind diagnosticul fitoplasmiei la diferite genotipuri de tomate, elaborarea unui sistem complex ce permite identificarea veridică a ,*Ca. P. solani*'. Analiza BLAST a secvențelor nucleotidice fitoplasmice a fost efectuată și a permis crearea a trei perechi de primeri ps pe baza secvenței genei chaperonin pentru identificarea specifică a ,*Ca. P. solani*'. Unele

perechi de primeri ps create pentru diagnosticul molecular al infecției ,*Ca. P. solani*' au fost testate prin metoda *nested*-PCR. Perechile de primeri create pentru diagnosticul molecular al infecției ,*Ca. P. solani*' au fost testate și prin metoda *one-step* PCR, ce permite minimizarea reactivelor și a timpului pentru diagnosticul fitopatogenului. La fel două perechi de primeri au fost create pentru *Real-Time* PCR. Condițiile optime pentru analizele date au fost elaborate.

Diferite metode de extragere a ADN (alcalină expres, "microwave", metoda CTAB) au fost optimizate și evaluate prin compararea rezultatelor obținute în urma diagnosticul molecular al fitoplasmei. Metoda expres poate fi estimată ca cea mai validă, ce permite analiza unui eșantion de plante într-un timp relativ scurt. Plantele ale cinci soiuri de tomate autohtone și a formei spontane *Solanum habrochaites* au fost plantate și cultivate. Materialul vegetal (frunze, fructe și peduncule) a fost analizat la prezența fitoplasmei. A fost determinat că este necesar de a izola ADN din organele bogate în floem pentru obținerea rezultatelor veridice. Identificarea fitoplasmei a fost efectuată la diferite genotipuri de tomate pe parcursul de perioadei de vegetație a permis la constatarea privind sensibilitatea diferențiată a lor la fitoplasma. Soiul Cerasus fiind mai rezistent la infecția ,*Ca. P. solani*'. Procentul plantelor infectate a fost semnificativ mai mic comparativ cu alte soiuri analizate. A fost constatată lipsa infecției date la forma spontană (control). Aceste rezultate pot fi utilizate în ameliorarea direcționată pentru crearea soiurilor rezistente la infecția ,*Ca. P. solani*'. De asemenea a fost elaborat un soft pentru prelucrarea statistică a datelor ce permite de a stabili volumurile optime și perioada de colectare ale probelor pentru analiza moleculară cu obținerea rezultatelor statistic-semnificative.

Astfel a fost elaborat un sistem de detectare rapidă și fiabilă a bolii poate reduce pierderile de roadă și poate preveni răspândirea ulterioară a infecției fitoplasmice, iar utilizarea soiurilor rezistente de tomate asigură o producție ecologică cu minimizarea pierderilor de producție.

11. Concluzii.

1. Gena chaperonin este cea mai potrivită pentru crearea primerilor cu scopul identificării infecției ,*Ca. P. solani*' la tomate în urma analizei comparative a secvențelor din bază de date GenBank și a analizei BLAST,.
2. Șase primeri chaperonine ps au fost creați și testați. Cele mai bune rezultate au fost obținute utilizând perechea ps2-ps5 în runda I și perechea ps3-ps4 în runda a II-a. La fel, au fost alese programele optime de amplificare pentru ambele runde.
3. Metoda alcalină expres de extragere a ADN din peduncule de tomate permite obținerea rezultatelor fiabile în diagnosticul molecular al ,*Ca. P. solani*' atât la etapele timpurii de dezvoltare ale plantelor cât și la etapele tardive. O concluzie este că această metodă poate fi utilizată în elaborarea tehnicii noi de evaluare a rezistenței tomatelor la fitoplasmoză.
4. Metoda "microwave" de extracție a ADN nu este potrivită pentru estimarea rezistenței plantelor de tomate la ,*Ca. P. solani*' la etapele timpurii de dezvoltare a tomatelor, dar poate fi utilizată la etapele tardive când plantele sunt infectate semnificativ. S-a făcut concluzie că utilizarea

metodei K-acetat de extracție a ADN-ului este mai eficientă în comparație cu metoda "microwave" pentru diagnosticul molecular al ,*Ca. P. solani*' în plantele de tomate.

5. Validitatea metodelor optimizate de extragere a ADN "alcalină express" și "K-acetat" pentru diagnosticul molecular al ,*Ca. P. solani*' în tomate a fost confirmată.
6. Diagnosticul molecular al ,*Ca. P. solani*' în primul sezon de vegetație la plantele ale patru soiuri de tomate a fost efectuat. Prelucrarea statistică ale rezultatelor obținute a permis de a face o concluzie preliminară privind rezistența soiurilor analizate la infecția fitoplasmică. La fel, soiurile Cerasus și Mary Gratifully sunt mai rezistente în comparație cu soiurile Elvira și Cerasus. O concluzie adițională a fost făcută că diferențele în sensibilitatea soiurilor analizate la ,*Ca. P. solani*' sunt demonstrate mai clarific la etapa coacerii a fructelor în masă, la materialul vegetal colectat în luna august.
7. A fost elaborat soft-ul pentru prelucrarea statistică a datelor despre infecția fitoplasmică la tomate, care permite calcularea semnificației diferenței dintre două populații originale (valoarea P în conformitate cu criteriului Fișer), cât și calcularea semnificației diferenței dintre toate perechile de subpopulații alese aleatoriu (analiza Jackknife).
8. Rezistența diferențiată la infecția fitoplasmică a soiurilor Cerasus și Elvira a fost confirmată și în al doilea sezon de vegetație.
9. Specia de tomate *Solanum habrochaites* poate fi utilizată ca control pentru că plantele ale acestei specii nu a fost infectate cu *Ca. P. solani* în decursul sezonului de vegetație.
10. Perioada de maturare în masă a fructelor este cea mai potrivită pentru estimarea rezistenței soiurilor de tomate la infecția fitoplasmică.
11. Analiza moleculară a 12 plante într-un soi este suficientă pentru obținerea rezultatelor semnificative din punct de vedere statistic.
12. Perechile de primeri ps1-ps4 și ps3-ps4 pot fi utilizată pentru identificarea fitoplasmei în plantele de tomate prin analiza *one-step* PCR.
13. Diagnosticul molecular cantitativ al ,*Ca. P. solani*' în plantele de tomate poate fi realizat prin metodele *Real-Time PCR* (primeri *forward* qfys5, qfys7; *reverse* qfys6, qfys8) sau "semi-cantitativ" PCR cu diluții consecutive ale ADN-ul extras din plante în rândurile de la 3×10^{-4} până la 4×10^{-9} .

12. Bugetul proiectului, lista executorilor, lista tinerilor cercetători, doctoranzilor

Anexa nr. 1

Volumul total al finanțării (mii lei) (pe ani)

Anul	Planificat	Executat	Cofinanțare
2018	100000	100000	0
2019	150000	150000	0

Lista executorilor (funcția în cadrul proiectului, titlul științific, semnătura)

Nr d/o	Numele/Prenumele	Anul nașterii	Titlul științific	Funcția în cadrul proiectului	Semnătura
1	Zamorzaeva-Orleanscaia Irina	1956	Doctor	Directorul proiectului	
2	Tumanova Lidia	1953	Doctor	Executor	
3	Mitin Valentin	1951		Executor	
4	Mihnea Nadejda	1959	Doctor habilitat	Executor	
5	Deaghileva Angela	1964	Doctor	Executor	
6	Belousova Galina	1955	Doctor	Executor	
7	Mitina Irina	1975	Doctor	Executor	
8	Ignatova Zoia	1959		Executor	
9	Bahșiev Aighiuni	1993		Executor	
10	Grăjdieru Cristina	1990		Executor	

Lista tinerilor cercetători

Nr d/o	Numele/Prenumele	Anul nașterii	Titlul științific	Funcția în cadrul proiectului
1	Bahșiev Aighiuni	1993		Executor
2	Grăjdieru Cristina	1990		Executor

Lista doctoranzilor

Nr d/o	Numele/Prenumele	Anul nașterii	Titlul științific	Funcția în cadrul proiectului
1	Bahșiev Aighiuni	1993		Executor
2	Grăjdieru Cristina	1990		Executor

Conducătorul proiectului Zamorzaeva-Orleanscaia Irina, dșb _____

13. Lista publicațiilor științifice ce țin de rezultatele obținute în cadrul proiectului

Anexa nr. 2

Articol din revista cu factor de impact :

1. ZAMORZAEVA, I.; BAHSEV, A.; TUMANOVA, L. Optimal timing and sampling for a reliable assessment of the resistance of tomato varieties to *Ca. P. solani*. *Phytopathogenic Mollicutes*. 2019, **9**(1), 159-160. ISSN 2249-4669. doi: [10.5958/2249-4677.2019.00080.X](https://doi.org/10.5958/2249-4677.2019.00080.X) (IF: 2.8).

Materiale ale conferințelor (naționale / internaționale) :

1. ZAMORZAEVA, I.; BAHSEV, A.; MIHNEA, N. Spread of phytoplasma infection in the tomato field depending on the climatic conditions of the year. În: *Материалы II Международной научной конференции „Тенденции развития агрофизики: от актуальных*

проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего”. Санкт-Петербург: ФГБНУ АФИ, 2019, 662-668. ISBN 978-5-905200-40-3.

2. BAHŞIEV, A.; MITIN, V.; ZAMORZAEVA, I. Testarea primerilor specifice pentru detecția *Candidatus Phytoplasma solani*. În: *Teze ale Simpozionului Științific Internațional „Biotehnologii avansate - realizări și perspective” (Ediția a V-a)*. Ch.: “Print-Caro”, 2019, p. 9. ISBN 978-9975-56-695-7.

14. Participări la manifestări științifice naționale/internaționale

Anexa nr. 3

1. Zamorzaeva-Orleanscaia Irina - Deplasarea la Reuniunea a IV-a Grupului de Lucru Internațional al Fitoplasmologiștilor (Spania, Valencia) de pe 8-12 septembrie 2019 a prezentat raportul oral cu subiectul „Optimal timing and sampling for a reliable assessment of the resistance of tomato varieties to *Ca. P. solani*”.
2. Bahşiev Aighiuni - Conferința Internațională „Tendințele dezvoltării agrofizicii: de la problemele actuale ale fitotehniei și a agriculturii spre tehnologiile viitorului”, ediția a II-a, de pe 02-04 octombrie 2019 în Sankt-Petersburg, Federația Rusă. Denumirea raportului oral „Spread of phytoplasma infection in the tomato field depending on the climatic conditions of the year”.

Conducătorul proiectului Zamorzaeva-Orleanscaia Irina, dșb _____